

CULTIVATION OF FIRST STAGE CULTURE HEPATIC CELL AND CULTIVATION KIT

Patent number: JP9103291
Publication date: 1997-04-22
Inventor: KAKINUMA JUNJI; ODA HIROAKI; KIMURA NORIKO
Applicant: WAKO PURE CHEM IND LTD
Classification:
- **international:** C12N5/06; C12N1/38; C12Q1/02; G01N33/48
- **european:**
Application number: JP19950288094 19951009
Priority number(s): JP19950288094 19951009

Report a data error here

Abstract of JP9103291

PROBLEM TO BE SOLVED: To inexpensively and efficiently culture the first stage hepatic cells by using a collagen type I as an extracellular substrate and a perfect synthetic medium free from insulin as a culture medium on the measurement of the drug metabolism capacity of liver. **SOLUTION:** In the cultivation of the first stage hepatic cells on the measurement of drug metabolism capacity of liver, collagen type I is used as an extracellular substrate and a perfect synthetic culture medium free from insulin, containing a compound having the action to develop and induce phenobarbital induction type cytochrome P-450 in hepatic cells (a barbituric acid compound) and a glucocorticoid having the action to enhance the development of the phenobarbital induction type cytochrome P-450 such as dexamethasone whereby the first stage hepatic cells can be cultured inexpensively and efficiently.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-103291

(43) 公開日 平成9年(1997)4月22日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/06			C 1 2 N 5/00	E
1/38			1/38	
C 1 2 Q 1/02		7823-4B	C 1 2 Q 1/02	
// G 0 1 N 33/48			G 0 1 N 33/48	M

審査請求 未請求 請求項の数14 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願平7-288094	(71) 出願人	000252300 和光純薬工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(22) 出願日	平成7年(1995)10月9日	(72) 発明者	垣沼 淳司 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-256 名古屋大学平針宿舍D-433
特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年4月10日 日本栄養・食糧学会発行の「第49回日本栄養・食糧学会 大会 講演要旨集」に発表		(72) 発明者	小田 裕昭 愛知県名古屋市天白区植田山3-1012 シ ャルム杉105号
		(72) 発明者	木村 紀子 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号 和光純薬工業株式会社内

(54) 【発明の名称】 初代培養肝細胞培養方法及び培養キット

(57) 【要約】

【課題】安価なI型コラーゲン(TIC)を細胞外基質として用いる、肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞の培養方法、フェノバルビタール(PB)誘導型チトクロームP-450を発現させ得る初代培養肝細胞の培養方法、及び初代培養肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現方法、並びにこれらに用いられる安価な初代培養肝細胞培養キットの提供。

【解決手段】例えば肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてTICを用い、且つ培地としてインスリンを含まない完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法。更に、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルココルチコイドを含有する該培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてI型コラーゲンをを用い、且つ培地として、インスリンを含まない完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法。

【請求項2】 肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてI型コラーゲンをを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルココルチコイドを含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法。

【請求項3】 フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450を発現させる初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてI型コラーゲンをを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法。

【請求項4】 フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450を発現させる初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてI型コラーゲンをを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物とフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルココルチコイドを含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法。

【請求項5】 細胞外基質としてI型コラーゲンをを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞培養に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現方法。

【請求項6】 細胞外基質としてI型コラーゲンをを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物とフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルココルチコイドを含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞培養に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現方法。

【請求項7】 グルココルチコイドが、デキサメタゾンである請求項2、4又は6の何れかに記載の方法。

【請求項8】 フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物が、バルビツール酸系化合物である請求項3～7の何れかに記載の方法。

【請求項9】 バルビツール酸系化合物が、フェノバルビタールである請求項8に記載の方法。

【請求項10】 (i)細胞外基質としてI型コラーゲンで覆われた培養基盤、(ii)インスリンを含まない完全合成培地、及び(iii)フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルココルチコイドを組み合わせてなることを特徴とする、肝臓の薬物代謝能測定用初代培養肝細胞培養キット。

【請求項11】 (i)細胞外基質としてI型コラーゲンで覆われた培養基盤、(ii)インスリンを含まない完全合成培地、(iii)肝細胞に於けるフェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物、及び(iv)フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルココルチコイドを組み合わせてなることを特徴とする、肝臓の薬物代謝能測定用初代培養肝細胞培養キット。

【請求項12】 フェノバルビタール誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物が、バルビツール酸系化合物である請求項11に記載の培養キット。

【請求項13】 バルビツール酸系化合物が、フェノバルビタールである請求項12に記載の培養キット。

【請求項14】 グルココルチコイドが、デキサメタゾンである請求項10～13の何れかに記載の培養キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞の培養方法及びそれに用いる培養キットに関する。

【0002】

【従来の技術】薬物代謝、糖新生、脂質代謝等の機能を有する肝臓は、生体内に於て多様且つ重要な役割を担っている。これら種々の肝機能の研究、或は発癌物質を含む各種の薬物・毒物の代謝解毒のアクセシ法の確立等の目的に於て、肝細胞の培養は極めて重要である。これまで肝細胞の培養では、培養細胞として樹立肝細胞株や初代培養肝細胞等が用いられているが、樹立肝細胞の多くは肝癌細胞であり、肝臓の実質細胞とは異なる性質を有するものであるため、肝癌細胞を用いて得られた実験結果をそのまま生体に於ける代謝等の生命現象を反映したものとして受け入れ難い等の問題点があり、初代培養肝細胞の方が肝臓細胞に近く、培養細胞として好ましいものと考えられてきた。

【0003】また、肝臓の薬物代謝機能に於て中心的な役割を担うチトクロームP-450は、メチルコラズレン（以下、MCと略記する。）に代表される化合物により発現が誘導されるMC誘導型チトクロームP-450（CYP1A1及びCYP1A2）と、フェノバルビタール（以下、PBと略記する。）に代表される化合物により発現

が誘導されるPB誘導型チトクロームP-450 (CYP2B1及びCYP2B2)との2つのタイプに大別される。しかしながら、MC誘導型チトクロームP-450は、樹立肝細胞株(肝癌細胞)に於てもその発現が誘導されるが、PB誘導型チトクロームP-450は、樹立肝細胞株や初代培養肝細胞では、その発現誘導が殆ど認められないものであった。また、最近の肝細胞に於ける薬物代謝の指標として用いられるのは主としてPB誘導型チトクロームP-450であるため、初代培養肝細胞培養時にPB等によりPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導が起こることが確認された初代培養肝細胞の培養方法は、生体内に於ける各種薬物・毒物等の化学物質等の影響(薬効・毒性等)を測定するための培養方法として、或は、生体内に於て、該化学物質等が、チトクロームP-450の作用を受けてどのような性質の反応代謝産物となるのか(例えば、発癌性物質等の有害物質となるのか否か等)を調べるための培養方法として、極めて有用なものである。

【0004】しかしながら、培養肝細胞の3次元構造、細胞-細胞外基質相互作用、細胞-細胞相互作用等の要因により、従来の細胞外基質、例えばI型コラーゲン(以下、TICと略記する。)等を使用して初代培養肝細胞を培養した場合、肝臓特異的機能、例えば、チトクロームP-450のPBによる誘導が、培養に伴い著しく低下するという問題や、チトクロームP-450発現機能等が培養に伴い著しく低下するという問題等があった。

【0005】近年、マウスEHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 肉腫由来の、ラミニン、IV型コラーゲン及びプロテオグリカンに富むEHS-gel [日本ベクトン・ディッキンソン(株)製]を細胞外基質として、初代培養肝細胞を培養すれば、培養細胞に於ても肝臓と同程度にPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導を観察できることが見出された。初代培養肝細胞を従来の細胞外基質を用いて培養した場合にはその誘導が殆ど認められないことから、この効果は、EHS-gelを用いて培養した場合に特有のものと考えられていた。

【0006】しかしながら、このEHS-gelは、マウスEHS肉腫を原料としているため、大量生産が困難であり、且つ極めて高価なものであった。

【0007】従って、安価なTICを細胞外基質として用いた、肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞の培養方法、PB誘導型チトクロームP-450を発現させ得る初代培養肝細胞の培養方法或はPB誘導型チトクロームP-450の発現方法の開発が望まれている現状にある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記した如き状況に鑑みなされたもので、安価なTICを細胞外基質として用いる、肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培

養肝細胞の培養方法、PB誘導型チトクロームP-450を発現させ得る初代培養肝細胞の培養方法、及び初代培養肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現方法、並びに、これらに用いられる安価な初代培養肝細胞培養キットを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてTICを用い、且つ培地として、インスリンを含まない完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法、の発明である。

【0010】また、本発明は、肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてTICを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルコイドを含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法、の発明である。

【0011】更に、本発明は、PB誘導型チトクロームP-450を発現させる初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてTICを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法、の発明である。

【0012】また、本発明は、PB誘導型チトクロームP-450を発現させる初代培養肝細胞培養方法に於て、細胞外基質としてTICを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物とPB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルコイドを含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞の培養方法、の発明である。

【0013】更にまた、本発明は、細胞外基質としてTICを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞培養に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現方法、の発明である。

【0014】また、本発明は、細胞外基質としてTICを用い、且つ培地として、インスリンを含まず、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物とPB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルコイドを含有する完全合成培地を使用することを特徴とする、初代培養肝細胞培養に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現方法、の発明である。

【0015】更に、本発明は、(i)細胞外基質としてT

ICで覆われた培養基盤、(ii)インスリンを含まない完全合成培地、及び(iii)PB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルチコイドを組み合わせてなることを特徴とする、肝臓の薬物代謝能測定用初代培養肝細胞培養キット、の発明である。

【0016】更にまた、本発明は、(i)細胞外基質としてTICで覆われた培養基盤、(ii)インスリンを含まない完全合成培地、(iii)肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物、及び(iv)PB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルチコイドを組み合わせてなることを特徴とする、肝臓の薬物代謝能測定用初代培養肝細胞培養キット、の発明である。

【0017】即ち、本発明者らは、安価なTICを細胞外基質として用いて初代培養肝細胞を培養し、該肝細胞にPB誘導型チトクロームP-450を発現させ得る方法を見出すべく鋭意研究の途上、従来初代培養肝細胞用培地に於ける必須のホルモンとして当該培地に添加されてきたインスリンに、例えばPB等のバルビツール酸系化合物等の肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物によるチトクロームP-450の発現を抑制する作用があることを見出した。そこで、この知見に基づいて更に研究を行い、インスリンを含まない完全合成培地を使用して初代培養肝細胞を培養すれば、細胞外基質としてTICを用いた場合でも、該肝細胞にPB等の種々の生体内異物によりPB誘導型チトクロームP-450を発現させ得ること、更には、該培地中に更に、グルコシルチコイドの一種であるデキサメタゾンを共存させることにより、PB等の種々の生体内異物によるPB誘導型チトクロームP-450の発現効果を更に増加させ得ること、言い換えれば、インスリンを含まず、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルチコイドを含有する完全合成培地を使用して初代培養肝細胞を培養すれば、細胞外基質としてTICを用いた場合でも、種々の生体内異物によるPB誘導型チトクロームP-450の発現を高レベルで且つ長期間誘導させ得ることを見出し本発明を完成するに至った。

【0018】本発明に用いられる細胞外基質としては、TICであれば如何なるものでも良く、その由来、形状等については特に限定されない。また、TICは通常、培養基盤にコートした状態(例えば、TICを培養基盤に付着乾燥させたものや、或は、ゲル状のTICを培養基盤に敷いたもの等。)で使用される。このような培養基盤としては、細胞外基質としてTICを使用し得るものであれば良く、特に限定されないが、その材質としては、例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート等の合成高分子化合物、ガラス、多孔性ガラス、スリガラス等の無機物質等が挙げられる。また、これら培養基盤

は、プレート、フォローファイバーチューブ、シリンダー等多種多様の形態で使用し得る。尚、これら培養基盤に細胞外基質をコーティングする方法としては、通常この分野で行われている方法であれば特に限定されないが、例えば、文献「Cellmatrix コラーゲンをを用いる細胞培養法、P.25、第三版(1989)新田ゼラチン(株)生物化学研究所 発行」等に記載の、コラーゲン・フィルムを作製後に中和することにより行う方法、中和後にコラーゲン・フィルムを作製することにより行う方法、コラーゲン・ゲル・マトリックスの調製法等が挙げられる。

【0019】本発明に於て、初代培養肝細胞を、PB誘導型チトクロームP-450を発現させることを目的として培養する際に用いられる完全合成培地としては、初代培養肝細胞を培養し得る化学的に明らかな物質で構成されている、インスリンを含まない培地であれば特に限定されないが、例えば、通常、初代培養肝細胞の培養に於て用いられる、例えばWaymouth MB752/1培地、Williams E培地、Ham F12培地とDulbecco変法Eagle培地の1:1の混合培地、Chee's培地等の所謂完全合成培地が挙げられる。尚、インスリンを含まない培地とは、インスリンを全く含まない培地、若しくはインスリンを含有していたとしても、その量がPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物によるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を阻害しない量であるような培地のことである。また、このような完全合成培地には、通常この分野で使用される、例えばアンホテリシンB、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質等が含まれていてもよい。更に、このような完全合成培地に、PB誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルチコイドを添加すれば、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導をより高レベルで且つ長期間渡って持続させることが可能となるのでより好ましい。

【0020】本発明に於て用いられる、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物としては、初代培養肝細胞培養時に、肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現を誘導する作用を有する化合物であれば良く、特に限定されないが、例えばPB、ペンタバルビタール、バルビタール、アロバルビタール、アモバルビタール、シクロバルビタール、ヘキソバルビタール、チオペンタール等のバルビツール酸系化合物、P,P'-ジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)、ポリ塩素化ビフェニル(PCB)等が挙げられる。また、これらの培地中の濃度としては、該化合物の種類により異なるため一概には言えないが、例えばPBを用いた場合、通常 10^{-2} M以下、好ましくは 0.2×10^{-3} M $\sim 5 \times 10^{-3}$ M、より好ましくは 0.5×10^{-3} M $\sim 2 \times 10^{-3}$ Mの範囲から適宜選択される。尚、これらPB誘導型チトクロームP-450の発現を誘導す

る作用を有する化合物は、単独で用いても2種以上を適宜組み合わせ用いても何れにても良い。

【0021】本発明に於て用いられるグルココルチコイドとしては、初代培養肝細胞に於て、PB誘導型チトクロームP-450の発現を誘導する作用を有する化合物によるチトクロームP-450の発現誘導を増強する作用を有するものであれば良く、特に限定されないが、例えば、コルチゾール、コルチコステロン、コルチゾン等の副腎皮質ステロイドホルモン、例えばデキサメタゾン、プレドニソロン等の合成グルココルチコイド等のなかから適宜選択された、前述の如き性質を有するグルココルチコイドが挙げられる。また、これらの培地中の濃度としては、通常 10^{-4} M以下、好ましくは 10^{-9} M \sim 10^{-5} M、より好ましくは 10^{-8} M \sim 10^{-6} Mの範囲から適宜選択される。尚、これらグルココルチコイドは、単独で用いても2種以上を適宜組み合わせ用いても何れにても良い。

【0022】本発明に係る初代培養肝細胞としては、初代培養肝細胞として通常用いられるものであれば良く、その由来については特に限定されない。このようなものとしては、例えば、コラゲナーゼ灌流法〔中村敏一(1987) 初代培養肝細胞実験法、学会出版センター〕、コラゲナーゼ振とう法〔中村敏一(1987) 初代培養肝細胞実験法、学会出版センター〕等、この分野で通常行われている分離方法により得られた、例えばラット、マウス、ウサギ、ヒト等に由来する肝実質細胞等が挙げられる。

【0023】本発明の培養方法、或は発現方法に於ける、初代培養肝細胞の培養は、TICを細胞外基質として使用した培養基盤と上記した如き成分の完全合成培地を使用する以外は、この分野に於て通常行われる初代培養肝細胞の培養方法に準じて行えば良く、例えば温度、湿度、CO₂分圧、培養時間等の培養条件は、通常の初代培養肝細胞の培養条件に準じて、PB誘導型チトクロームP-450の高い発現誘導が得られるように適宜選択して設定すれば良く、特に限定されない。

【0024】本発明の培養方法或は発現方法は、より具体的には例えば以下の如く実施すればよい。即ち、先ず、上記した如き方法で得られた肝実質細胞を、培養に適した濃度、例えば100mmディッシュに培地10mlを使用して培養する場合であれば、通常 $10^6 \sim 10^7$ 細胞/10ml、好ましくは $3 \times 10^6 \sim 7 \times 10^6$ 細胞/10mlとなるように上記した如き成分の完全合成培地に懸濁する。得られた懸濁液を、上記した如きTICを細胞外基質として使用した培養基盤に注入し、これを通常5%のCO₂を含む空気中で、通常30 \sim 40 $^{\circ}$ C、好ましくは35 \sim 38 $^{\circ}$ Cで、通常4 \sim 96時間、好ましくは24 \sim 48時間前培養する。尚、前培養時に使用する完全合成培地中には、細胞成長因子(必須ホルモン)として適量のインスリンを含有させておいても良い。その後、肝細胞による代謝能を検討したい薬物等、或は肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP

-450の発現誘導作用を有する化合物等を更に添加した培地に交換して、通常5%のCO₂を含む空気中で、通常30 \sim 40 $^{\circ}$ C、好ましくは35 \sim 38 $^{\circ}$ Cで、通常4 \sim 96時間、好ましくは24 \sim 48時間前培養を行うことにより実施できる。尚、ここで用いられる、肝細胞による代謝能を検討したい薬物等の使用濃度としては、該薬物等の種類等により異なるため一概には言えず、該薬物等の種類により適宜選択される。また、ここで使用する完全合成培地中には、PB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物によるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を阻害しない量であれば、インスリンが含まれていても良い。

【0025】尚、培養の結果どの程度のPB誘導型チトクロームP-450が発現したかの確認は、この分野に於ける常法、例えばノーザン法、RNaseプロテクション・アッセイ法、スロットブロット法等〔Frederick M. Ausubelら、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(1987)〕によりPB誘導型チトクロームP-450の発現に関連するmRNA量を測定する方法、例えばウエスタン法〔Frederick M. Ausubelら、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(1987)〕、酵素免疫測定法(東京化学同人 統生化学実験講座5 免疫生化学研究法 P.62-65)等により発現したPB誘導型チトクロームP-450のタンパク質量を測定する方法等により行えばよい。尚、初代培養肝細胞を上記した如くして通常4 \sim 96時間、前培養し、その後種々の薬物等を共存させ、インスリンを含まない初代培養肝細胞用の所謂完全合成培地を用いて更に培養することにより、これら薬物等の肝細胞に於ける代謝の程度を、PB誘導型チトクロームP-450の発現の程度を指標として観察することが可能となる。更に、該薬物等が肝臓により代謝される性質を有しているものである場合、この肝細胞代謝産物を培地中から適当な方法により採取すれば、該代謝産物が人体にとって有害な性質(例えば発癌性、細胞損傷性等)を有しているか否かの判定にこれを供することができる。また、このような目的で用いられる培地中に、PB誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物によるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導を増強する作用を有するグルココルチコイドを上記した如き濃度で共存させておけば、薬物等による肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現誘導の程度がより増強されるので、その発現をより明確に観察することが可能となる。尚、該グルココルチコイドの培地中への添加時期としては、本発明の目的を達成し得る時期であればよく特に限定されないが、例えば、前培養時から該完全合成培地中に含有させておいてもよいし、前培養後、該薬物等を培地に共存させる際に含有させるようにしても良い。また、初代培養肝細胞を上記した如くして通常4 \sim 96時間、前培養し、その後肝細胞に於けるP

B誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物を上記した如き濃度となるように培地に添加した、インスリンを含まない初代培養肝細胞用の所謂完全合成培地を用いて更に培養することにより、肝細胞にP B誘導型チトクロームP-450を発現させることができるので、これを種々の薬物等の肝細胞に於ける代謝の程度を観察する際の対照(標準)として用いることができる。更に、このような状態とした後に(P B誘導型チトクロームP-450を発現させた後に)、培地中に適当な薬物等を共存させた場合、これが肝臓により代謝される性質を有しているものであれば、肝細胞により代謝されるので、生じた代謝産物を適当な方法により採取すれば、該代謝産物が人体にとって有害な性質(例えば発癌性、細胞損傷性等)を有しているか否かの判定にこれを供することができる。また、このような目的で用いられる培地中に、P B誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物によるP B誘導型チトクロームP-450の発現誘導を増強する作用を有するグルコシルコイドを上記した如き濃度で共存させておけば、肝細胞に於けるP B誘導型チトクロームP-450の発現誘導をより高レベルで且つ長期に渡って持続させることが可能となる。尚、該グルコシルコイドの培地中への添加時期としては、本発明の目的を達成し得る時期であればよく特に限定されないが、例えば、前培養時から該完全合成培地中に含有させておいてもよいし、前培養後、該P B誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物又は/及び該薬物等を培地に共存させる際に含有させるようにしても良い。

【0026】本発明の肝臓の薬物代謝能測定用初代培養肝細胞培養キットは、例えば、種々の薬物等の肝細胞に於ける代謝の程度を、P B誘導型チトクロームP-450の発現の程度を指標として観察することや、該薬物等の肝臓による代謝産物が人体にとって有害な性質を有しているか否かを判定するために該代謝産物を採取すること等を目的とする初代培養肝細胞の培養をより効果的に実施するために使用されるもので、(i)細胞外基質としてT I Cで覆われた培養基盤、(ii)インスリンを含まない完全合成培地、及び(iii)P B誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルコイドを組み合わせてなるものであり、夫々の構成要素の好ましい態様、具体例等については先に述べた通りであるが、代表的な例としては、例えば以下のような組み合わせのものが挙げられる。

(i)T I Cをコートしたポリスチレンプレート。

(ii)Waymouth MB752/1培地。

注：実際の培養に使用する培地は、これを基に例えば以下の如くして調製される。Waymouth MB752/1培地(L-グルタミン含有、NaHCO₃非含有：GIBCO BRL社製)14.12gに蒸留水900mlを添加した。これにNaHCO₃ 2.24g、アンホテリシンB液(I C N社製)10ml、ペニシリン・スト

レプトマイシン液(GIBCO BRL社製)10mlを加えて攪拌し、これをpH7.4に調整した後、全量を1000mlとし、0.22μmのメンブレンフィルターで濾過滅菌したもの。

(iii)D e x。

注：これを培地中に添加するに当たっては、例えば10⁻³M D e x含有メタノール溶液とした後に適当量を培地に添加して使用すればよい。

【0027】更に、本発明の肝臓の薬物代謝能測定用初代培養肝細胞培養キットは、例えば、種々の薬物等の肝細胞に於ける代謝の程度を観察する際の対照(標準)として用いることや、該薬物等の肝臓による代謝産物が人体にとって有害な性質を有しているか否かを判定するために該代謝産物を採取すること等を目的とする初代培養肝細胞の培養、或は、初代培養肝細胞に於けるP B誘導型チトクロームP-450をより効果的に発現させるために使用されるもので、(i)細胞外基質としてT I Cで覆われた培養基盤、(ii)インスリンを含まない完全合成培地、(iii)肝細胞に於けるP B誘導型チトクロームP-450の発現誘導作用を有する化合物、及び(iv)P B誘導型チトクロームP-450の発現増強作用を有するグルコシルコイドを組み合わせてなるものであり、夫々の構成要素の好ましい態様、具体例等については先に述べた通りであるが、代表的な例としては、例えば以下のような組み合わせのものが挙げられる。

(i)T I Cをコートしたポリスチレンプレート。

(ii)Waymouth MB752/1培地。

注：実際の培養に使用する培地は、これを基に例えば以下の如くして調製される。Waymouth MB752/1培地(L-グルタミン含有、NaHCO₃非含有：GIBCO BRL社製)14.12gに蒸留水900mlを添加した。これにNaHCO₃ 2.24g、アンホテリシンB液(I C N社製)10ml、ペニシリン・ストレプトマイシン液(GIBCO BRL社製)10mlを加えて攪拌し、これをpH7.4に調整した後、全量を1000mlとし、0.22μmのメンブレンフィルターで濾過滅菌したもの。

(iii)P B。

注：これを培地中に添加するに当たっては、例えば2M P B含有P B S溶液とした後に、適当量培地に添加して使用すればよい。

(iv)D e x。

注：これを培地中に添加するに当たっては、例えば10⁻³M D e x含有メタノール溶液とした後に、適当量を培地に添加して使用する。

【0028】以下に、参考例及び実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等制限されるものではない。

【0029】

【実施例】

参考例. 1 初代培養肝細胞の分離

【試薬の調製】以下の試薬を、手順に従ってそれぞれ調製した。

・前灌流液: NaCl 8g、KCl 0.4g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.078g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.151g、HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸) 2.38g、フェノールレッド 0.006g、EDTA 0.19g、 NaHCO_3 0.35g、グルコース 0.9gを蒸留水900mlに溶解し、1N NaOHでpHを7.2に調整して全量を1000mlとしたものを前灌流液とした。

・コラゲナーゼ溶液

NaCl 8g、KCl 0.4g、 Na_2HPO_4 47.9mg、 KH_2PO_4 60mg、 MgSO_4 48.8mg、 MgCl_2 46.8mg、 CaCl_2 0.55g、グルコース 1g、フェノールレッド 6mg、HEPES 2.38g、 NaHCO_3 0.35gを蒸留水900mlに攪拌、溶解した。これにコラゲナーゼ〔034-10533: 和光純薬工業(株)社製〕0.5gとトリプシンインヒビター(T-9128: シグマ社製) 20mgを添加して、溶けるまで攪拌した。溶解後、1N NaOHでpH7.5に調整した後、これに蒸留水を加えて全量を1000mlとし、0.22 μm のメンブレンフィルターを用いて過剰滅菌し、滅菌済みのメディウム瓶に200mlずつ分注してコラゲナーゼ溶液とした。この溶液は、使用まで4℃で保存した。

・細胞洗浄用MEM培地

NaCl 6.8g、KCl 0.4g、 NaH_2PO_4 1.15g、 MgSO_4 93.5mg、グルコース 1g、L-アルギニン塩酸塩 126mg、L-システイン塩酸塩(一水塩) 31.4mg、L-チロシン 36mg、L-ヒスチジン塩酸塩(一水塩) 42mg、L-イソロイシン 52mg、L-ロイシン 52mg、L-リジン塩酸塩 73mg、L-メチオニン 15mg、L-フェニルアラニン 32mg、L-スレオニン 48mg、L-トリプトファン 10mg、L-バリン 46mg、コハク酸 75mg、コハク酸ナトリウム 60mg、重酒石酸コリン 1.8mg、葉酸 1mg、イノシトール 2mg、ニコチン酸アミド 1mg、パントテン酸カルシウム 1mg、塩酸ピリドキサル 1mg、リボフラビン 0.1mg、塩酸チアミン 1mg、ビオチン 0.02mg、カナマイシン60mg(力価)、フェノールレッド 6mgを蒸留水900mlに攪拌、溶解後、全量を1000mlとした。これを滅菌済みのメディウム瓶に500mlずつ分注し、121℃で20分間オートクレーブ滅菌して、4℃で保存した。使用時に、この500mlにオートクレーブ滅菌済みの7% NaHCO_3 溶液35mlを添加して、細胞洗浄用MEM培地とした。

【0030】〔肝細胞分離用ラット〕体重150g前後のWistar系雄ラット(日本S.L.C社製)を、肝細胞分離までの間(2~10日間)、23℃前後の動物室内で金網ゲージに1匹ずつ入れ、固形飼料(ラボMRストック: 日本農産工業社製)と水を自由摂取させて飼育したものをを用いた。

【0031】〔肝細胞の分離〕肝細胞は、中村らの方法〔中村敏一(1987) 初代培養肝細胞実験法、学会出版センター〕に従い、コラゲナーゼ灌流法によって以下のように分離した。即ち、ネブタール(ダイナボット社製)麻酔下のラットの全身を0.02%ヒビテン液(ICIファーマ社製)で消毒し、該ラットを開腹して門脈を

露出させた。この門脈に縫合糸のループをかけた後、門脈に切れ目を入れた。切開部から溢れ出る血液を、カニユーレの先端から滴下させた前灌流液で洗い流しながら、素早く門脈の切開部からカニユーレを挿入し、縫合糸で結紮した。同時に、肝臓下の下大静脈を切断し、流速20ml/minで灌流し、脱血して前灌流液を放出させた。次いで、該ラットの胸部を開いて心臓を露出させ、横隔膜下の下大静脈に縫合糸のループをかけた後、先に切断した肝臓下の下大静脈を鉗子で結紮し、右心房を切開し灌流液排出用のカニユーレを右心房から下大静脈に挿入して結紮した。この状態で灌流を続け、前灌流液がなくなりそうになったらポンプを止め、前灌流液をコラゲナーゼ溶液に交換して再び灌流を行った。開始後30秒間は流速30ml/minで灌流し、その後流速20ml/minでコラゲナーゼ溶液がなくなるまで灌流した。灌流終了後、肝臓をシャーレに移してメスで軽く細分し、約20mlの細胞洗浄用MEM培地を加えて先太駒込ビベットで軽く懸濁した後、細胞過剰器で過剰した。得られた粗分散細胞浮遊液を500~600rpmで90秒間遠心処理した。遠心後、上清を吸引して除き、新たに細胞洗浄用MEM培地を加えて再び遠心処理した。この操作を合計3回繰り返すことにより、ほぼ均一な肝実質細胞を得た。得られた肝実質細胞に、細胞洗浄用MEM培地20mlを加えて懸濁し、この肝実質細胞懸濁液0.2mlに、トリパンブルー0.2mlと細胞洗浄用MEM培地 1.6mlを加え、生細胞数及び細胞濃度(総細胞数)を、通常行われる細胞計数法〔(株)朝倉書店、日本組織培養学会編 組織培養の技術 P.20~22〕に従い計測した。

【0032】実施例. 1

(1) 初代培養肝細胞の培養

〔試薬の調製〕以下の試薬を、手順に従ってそれぞれ調製した。

・Waymouth MB752/1培地

Waymouth MB752/1培地(L-グルタミン含有、 NaHCO_3 非含有: GIBCO BRL社製) 14.12gに蒸留水900mlを添加した。これに NaHCO_3 2.24g、アンホテリシンB液(ICN社製) 10ml、ペニシリン・ストレプトマイシン液(GIBCO BRL社製) 10mlを加えて攪拌した。これをpH7.4に調整した後、全量を1000mlとし、0.22 μm のメンブレンフィルターで過剰滅菌したものをWaymouth MB752/1培地とした。

・Dulbecco's PBS

NaCl 8g、KCl 0.2g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g、 KH_2PO_4 0.2gに蒸留水900mlを加え、溶けるまで攪拌した。これに蒸留水を加え、全量を1000mlとし、Dulbecco's PBSとした。この溶液は、使用まで4℃で保存した。

【0033】〔初代培養肝細胞の培養〕参考例. 1で得られた肝実質細胞を、 1×10^6 細胞/mlとなるように、上記で調製したWaymouth MB752/1培地(アンホテリシン2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ペニシリン50IU/ml及びストレプトマイ

シン50 μ g/ml含有)に懸濁し、この10mlを、TICをコートした100mmディッシュ〔IWAKI、COLLAGEN COATED WARE 4020-010:岩城硝子(株)製〕25枚に分注し、5%CO₂を含む空气中で37℃で培養した。培養4時間後に、死細胞を取り除くため培地を捨て、Dulbecco's PBSで2回洗浄した後、新しい培地と交換した。25枚のディッシュのうち9枚については、その20時間後(培養24時間後)に、フェノバルビタール(PB)、インスリン(Ins)、デキサメタゾン(Dex)の各物質を夫々所定の組み合わせで所定濃度含有するWaymouth MB752/1培地培地に交換し、更に24時間培養した(総培養時間:48時間)。また、残りの16枚のディッシュのうち8枚については、死細胞を取り除いた20時間後(培養24時間後)は培地交換のみを行い、更に24時間後(培養48時間後)に、PB、Ins、Dexの各物質を夫々所定の組み合わせで所定濃度含有するWaymouth MB752/1培地培地に交換し、更に24時間培養した(総培養時間:72時間)。また、残りの8枚のディッシュについては、死細胞を取り除いた20時間後(培養24時間後)及びその24時間後(培養48時間後)は培地交換のみを行い、更に24時間後(培養72時間後)に、PB、Ins、Dexの各物質を夫々所定の組み合わせで所定濃度含有するWaymouth MB752/1培地培地に交換し、更に24時間培養した(総培養時間:96時間)。尚、PB、Ins、Dexは、以下の方法により培地に添加した。

PB: 2M PBを含有するPBS溶液を調製し、逕過滅菌した。これを培地に対して1/1000量添加し、培地中の終濃度を2mMとした。

Ins: 10⁻⁵M Insを含有する塩酸溶液を調製し、滅菌した。これを培地に対して1/200量添加し、培地中の終濃度を5×10⁻⁸Mとした。

Dex: 10⁻³M Dexを含有するエタノール溶液を調製し、滅菌した。これを培地に対して1/1000量添加し、培地中の終濃度を10⁻⁶Mとした。

【0034】(2)チトクロームP-450発現の確認〔試薬の調製〕

・RNA抽出用Solution D

4M グアニジウムチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム及び0.5%サルコシルの混合液100mlに、RNAを抽出する直前にβ-メルカプトエタノール0.72mlを加えて混合後、逕過滅菌したものをRNA抽出用Solution Dとした。

・5×ランニング・バッファー

MOAPS (3-モルホリノプロパンスルホン酸) 20.93g、酢酸ナトリウム 3.4g、0.5M EDTAナトリウム溶液(pH8.0) 5mlに、450mlの蒸留水を加えて溶解後、水酸化ナトリウム水溶液でpH7.0に調整し、500mlに定容した後オートクレーブ処理したものを5×ランニング・バッファーとした。

・ハイブリダイゼーションバッファー

50% ホルムアミド、1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、5×SSC、5×Denhardt's溶液、50mMリン酸ナトリウム緩衝液及び500 μ g/ml サケ精子DNAからなる水溶液を調製した後、滅菌逕過し、これをハイブリダイゼーションバッファーとした。

・洗浄液

0.1% SDSを含有する、0.1×SSCを調製した後、逕過滅菌し、これを洗浄液とした。

【0035】〔初代培養肝細胞からのRNAの抽出〕上記(1)で得られた各種初代培養肝細胞から、コムジンスキーとサッチの方法〔Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. 162:156-159 (1987)〕に従い、以下の操作によりRNAを抽出した。上記(1)で得られた、初代培養肝細胞を培養した100mm径の培養皿5mlの1×Dulbecco's PBSで1回洗浄し、1.5mlのRNA抽出用Solution Dを、更に加えた該細胞を含む溶液を15ml遠心チューブに回収した。更に、培養皿に1.5mlのRNA抽出用Solution Dを加えて再度洗浄し、この溶液も先の遠心チューブに併せて回収し、細胞が均一になるまで激しく攪拌した。得られた懸濁液に、滅菌蒸留水飽和フェノール溶液 3ml (1容)、2M 酢酸ナトリウム水溶液(pH4.0) 0.3ml (1/10容)及びクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)混液 0.65ml (1/5容)を加え、ボルテックスミキサーで激しく攪拌した。攪拌後、10分間水上に静置し、次いでスウィングローター型遠心機(SAKURA R90-23)により、20℃で20分間、3400rpmで遠心処理した。遠心後、上層を全量、15ml遠心チューブに移し、これに3mlのイソプロピルアルコールを加えてよく攪拌した。攪拌後、-20℃で1時間以上、若しくは-80℃で10分間放置した。その後、アングルローター型遠心機(HITACHI himac CR21、ローター 50F6A)により、4℃で20分間、10000g (9800rpm)で遠心処理し、デカンテーションにより上清を除去し、更にパスツールピペットで水滴を除去した。得られた沈殿に、0.4mlのRNA抽出用Solution Dを加え、沈殿を溶解した。得られた溶解液の全量を1.5mlマイクロチューブに移し、エタノールを1ml加えて-20℃で1時間以上、若しくは-80℃で10分間放置した。次いでこれを、4℃で10分間、15000rpmで遠心処理し、上清をデカンテーションにより除去した後、沈殿を70%エタノールで洗浄した。得られた沈殿を数分間風乾してエタノールを除去した後、滅菌蒸留水20~30 μ lを添加して沈殿を溶解しRNA溶液とした。尚、RNA溶液中のRNA量は、該溶液の260nmの吸光度から定量した。

【0036】〔RNAの電気泳動〕上記で得られたRNAを、トーマスの方法〔Thomas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201-5205〕に従い以下の如く電気泳動を行った。まず、Seakem GTGアガロース〔宝酒造(株)製〕1gに蒸留水62.7mlを加えてオートクレーブ処理し、アガロースを溶解した。このアガロース溶液を

約60℃まで冷やした後、特級ホルムアルデヒド17.8ml、5×ランニング・バッファー 20mlを加えて攪拌し、ゲルトレイに流し込みRNA電気泳動用アガロースゲルを作製した。一方、RNA溶液(全RNA量10~20μg) 4.5μl、5×ランニング・バッファー 2.0μl、ホルムアルデヒド 3.5μl、ホルムアミド 10μlをマイクロチューブに入れて混合した後、この混合液を65℃で10分間熱処理した。熱処理後、該マイクロチューブを直ちに氷中で冷却し、その後、ローディング・ソリューション(50%グリセロール、0.4%ブロムフェノールブルー、0.4%キシレンシアノール及び1mM EDTA)からなる水溶液に、10mg/mlエチジウムブロマイド溶液を1/10容加えたものを2μlづつ加え混合し、この混合液をRNA電気泳動用アガロースゲルのウェルに注入した。次いで、1×ランニング・バッファーを電気泳動槽に満たし、50~100Vで泳動した。

【0037】[RNAのプロット] 10×SSCを用いて、サザンの方法(Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98:503-517)に従い、上記で得られたゲルから、RNAをナイロンメンブレンフィルター(Hybond-N⁺; Amersham社製)に転写した。尚、メンブレンフィルターは、使用前に蒸留水、次いで10×SSCに、室温で12時間以上浸しておいた。転写処理を行った後、得られたメンブレンフィルターの余分な水分をろ紙で吸い取り、UVクロスリンク(FUNA-UV-LINKER FS-1500; フナコシ社製)による処理を行った後、該フィルターをろ紙に挟み、80℃で2時間ベーキングした。ベーキング後、フィルターをアルミホイルで包み、デシケーター中で保存した。

【0038】[チトクロームP-450遺伝子検出用プローブの標識] チトクロームP-450遺伝子をコードするcDNA〔藤井ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2793-2797 (1982)〕を含むプラスミドから該cDNAを抽出し、これをプローブとし、T4 Polynucleotide kinase (ニッポンジーン社製)及び[γ-³²P] ATPを用いて、これらのプローブの5'末端を³²Pで標識し、チトクロームP-450遺伝子検出用標識プローブを作製した。尚、該チトクロームP-450遺伝子をコードするcDNAを含むプラスミドは、東北大学、藤井義明先生よりご提供いただいた。

【0039】[チトクロームP-450遺伝子とのハイブリダイゼーション] 先ず、ビニール袋の中に、上記で得られたRNAを転写したメンブレンフィルター及び該フィルター100cm²当たり3mlのハイブリダイゼーションバッファーを入れ、口をポリシーラーで封じた後、該バッファーを該メンブレンフィルターに浸透させ、42℃のインキュベーター中で8時間から12時間プレハイブリダイゼーションを行った。次いで、ビニール袋の一部を切り、上記で作製した標識プローブを熱処理した後にバッファー1ml当たり1×10⁶cpmとなるように加え、袋を閉

じて、42℃のインキュベーター中で12時間以上ハイブリダイゼーションを行った。次いで、袋の一部を切り、中の溶液を捨て、少量の洗浄液で3回軽くすすいだ後、室温で15分間、該洗浄液で振とうして洗浄した(2回)。更に、該メンブレンフィルターを、該洗浄液に浸し、65℃で15分間振とうして洗浄した(2回)。次いで、ハイブリダイゼーションを行ったメンブレンフィルター上の放射能を、BAS〔BAS2000、富士フイルム(株)製〕により定量した。更に、その後、オートラジオグラフにより、-80℃で増感スクリーン存在下で感光させ、オートラジオグラムを作製した。オートラジオグラフの結果を図1及び図2に夫々示す。尚、図1は、Dexを添加しない培地を用いた結果を、また、図2は、Dexを添加した培地を用いた結果を夫々示す。また、図1及び図2中に於て、+は添加を、-は無添加を夫々示す。

【0040】図1の結果から明らかな如く、従来初代培養肝細胞用培地に於て、必須のホルモンとして培地に添加されてきたInsに、肝細胞に於けるPBによるチトクロームP-450の発現を抑制する作用があることが認められ、Insを含まない完全合成培地を使用して肝細胞を培養すれば、細胞外基質としてTICを用いた場合でも、PBにより該肝細胞にチトクロームP-450を発現させ得ることが判る。また、図1及び図2の結果から明らかな如く、Insを含まない完全合成培地を使用して初代培養肝細胞を培養した場合でも、Dexを含有させない場合には、培養72時間後以降は、PBによるチトクロームP-450の発現は認められないが、Dexを含有させた場合には、培養96時間後に於ても、PBによるチトクロームP-450の発現が観察されることが、言い換えれば、DexにPBによるチトクロームP-450の発現誘導を増強させる作用があることが判る。

【0041】実施例. 2

(1) 初代培養肝細胞の培養に於ける、細胞外基質の比較

〔試薬の調製〕

・Waymouth MB752/1培地

実施例. 1と同じ試薬を用い、同様の手順で調製した。

・Dulbecco's PBS

実施例. 1と同じ試薬を用い、同様の手順で調製した。

【0042】[初代培養肝細胞の培養] 参考例. 1で得られた肝実質細胞を、1×10⁶細胞/mlとなるように、上記で調製したWaymouth MB752/1培地(アンホテリシン2.5μg/ml、ペニシリン50IU/ml及びストレプトマイシン50μg/ml含有)に懸濁し、この10mlを、TICをコートした100mmディッシュ〔IWAKI, COLLAGEN COATED WARE 4020-010: 岩城硝子(株)製〕8枚及びEHS-ge1をコートした100mmディッシュ〔MATRIGELTM: Becton Dickinson (Collaborative Biomedical Products)

社製〕8枚、計16枚に分注し、5%CO₂を含む空気中で37℃で培養した。培養4時間後に、死細胞を取り除くため培地を捨て、Dulbecco's PBSで2回洗浄した後、新しい培地と交換した。その20時間後（培養24時間後）に、フェノバルビタール（PB）、インスリン（Ins）、デキサメタゾン（Dex）の各物質を夫々所定の組み合わせで所定濃度含有するWaymouth MB752/1培地培地に交換し、更に24時間培養した（総培養時間：48時間）。尚、PB、Ins、Dexは、以下の方法により培地に添加した。

PB：2M PBを含有するPBS溶液を調製し、100倍減菌した。これを培地に対して1/1000量添加し、培地中の終濃度を2mMとした。

Ins：10⁻⁵M Insを含有する塩酸溶液を調製し、滅菌した。これを培地に対して1/200量添加し、培地中の終濃度を5×10⁻⁸Mとした。

Dex：10⁻³M Dexを含有するエタノール溶液を調製し、滅菌した。これを培地に対して1/1000量添加し、培地中の終濃度を10⁻⁶Mとした。

【0043】（2）チトクロームP-450発現の確認
初代培養肝細胞として上記（1）で得られたものを使用した以外は、実施例1の（2）と同じ試薬を用い、同様の操作を行って、各種肝細胞中チトクロームP-450遺伝子についてのオートラジオグラムを作製した。オートラジオグラフィーの結果を図3に示す。尚、図3中に於て、+は添加を、-は無添加を夫々示す。

【0044】図3の結果から明らかな如く、TICを細胞外基質として用いた場合でも、培地としてInsを含まず、Dexを含有する完全合成培地を使用して初代培養肝細胞を培養すれば、EHS-gelを使用した場合と同様に、PBによるチトクロームP-450の発現を誘導し得ることが判る。

【0045】実施例3 初代培養肝細胞培養キット
代表的な例としては、以下のようなものが挙げられる。

（1）例えば、種々の薬物等の肝細胞に於ける代謝の程度を、PB誘導型チトクロームP-450の発現の程度を指標として観察すること、或は、該薬物等の肝臓による代謝産物が人体にとって有害な性質を有しているか否かを判定するために該代謝産物を採取すること等を目的とする初代培養肝細胞の培養に使用される、以下の(i)～(iii)を含む初代培養肝細胞培養キット。

(i) TICをコートしたポリスチレンプレート、(ii) Waymouth MB752/1培地、(iii) Dex。

【0046】（2）例えば、種々の薬物等の肝細胞に於ける代謝の程度を観察する際の対照（標準）として用い

ること、或は、該薬物等の肝臓による代謝産物が人体にとって有害な性質を有しているか否かを判定するために該代謝産物を採取すること等を目的とする初代培養肝細胞の培養、或は、初代培養肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450をより効果的に発現させるために使用される、以下の(i)～(iv)を含む初代培養肝細胞培養キット。

(i) TICをコートしたポリスチレンプレート。(ii) Waymouth MB752/1培地、(iii) PB、(iv) Dex。

【0047】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明は、安価なTICを細胞外基質として用いる、肝臓の薬物代謝能を測定する際の初代培養肝細胞の培養方法、PB誘導型チトクロームP-450を発現させる初代培養肝細胞の培養方法、及び初代培養肝細胞に於けるPB誘導型チトクロームP-450の発現方法、並びに、これらの方法に用いられる安価な初代培養肝細胞培養キットを提供するものであり、本発明の方法又はキットを使用して初代培養肝細胞を培養すれば、TICを細胞外基質として用いた場合でも、PB等の種々の生体内異物により、該肝細胞にPB誘導型チトクロームP-450を発現させることができ、更には、該チトクロームP-450を高レベルで且つ長期間発現させることできるので、斯業に貢献するところ大なる発明である。

【0048】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた、オートラジオグラフィーの結果を示したものである。

【図2】実施例1で得られた、オートラジオグラフィーの結果を示したものである。


【図3】実施例2で得られた、オートラジオグラフィーの結果を示したものである。

【符号の説明】

図1に於て、PBはフェノバルビタールを、Insはインスリンを夫々示す。また、+は添加を、-は無添加を夫々示す。図2に於て、PBはフェノバルビタールを、Dexはデキサメタゾンを、Insはインスリンを夫々示す。また、+は添加を、-は無添加を夫々示す。図3に於て、TICは細胞外基質としてI型コラーゲン使用して培養したことを、EHSは細胞外基質としてEHS（Engelbreth-Holm-Swarm）-gelを使用して培養したことを夫々示す。また、PBはフェノバルビタールを、Dexはデキサメタゾンを、Insはインスリンを夫々示し、+は添加を、-は無添加を夫々示す。

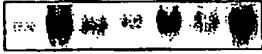
【図1】

培養時間	48時間			72時間			96時間		
P B	-	+	+	-	+	+	-	+	+
I n s	-	-	+	-	-	+	-	-	+



【図2】

培養時間	48時間			72時間			96時間		
P B	-	+	+	-	+	+	-	+	+
D e x	+	+	+	+	+	+	+	+	+
I n s	-	-	+	-	-	-	-	-	-



【図3】

細胞外基質	TIC	EHs	TIC	EHs	TIC	EHs	TIC	EHs
P B	-	-	+	+	+	+	+	+
D e x	-	-	-	-	+	+	+	+
I n s	-	-	-	-	-	-	+	+

